重组不可分型流感嗜血杆菌E蛋白与血浆脂蛋白（a）的相互作用

王瑜[1,4]　刘治[1,4]　白文成[2,4]　许丽萍[4]　韩润林[2,4*]

（1 内蒙古农业大学生命科学学院　呼和浩特　010018　2 内蒙古农业大学兽医学院　呼和浩特　010018）

（3 内蒙古医科大学基础医学院呼和浩特　010059　4 内蒙古农业大学血浆脂蛋白免疫学研究中心　呼和浩特　010018）

摘要　目的：E 蛋白（Protein E, PE）是不可分型流感嗜血杆菌（Nontypeable *Haemophilus influenza*, NTHi）表面的一种纤溶酶原（Plasminogen, Plg）受体，其 C 末端含有两个赖氨酸残基。NTHi 可通过其表面的 PE 与 Plg 结合，从而利用机体的纤溶系统深层入侵宿主。基于脂蛋白（a）[Lipoprotein(a), Lp(a)]中载脂蛋白（a）[Apolipoprotein(a), Apo(a)]与 Plg 高度的同源性，本研究拟证明 Lp(a)是否会与重组表达的 PE（rPE）结合。方法：原核表达并纯化 rPE 及敲除 C 末端两个赖氨酸残基的 rPEΔKK，密度梯度离心结合阴离子交换层析分离人血浆 Lp(a)，通过 ELISA、Pull down、Western blot 等方法研究 rPE 与 Lp(a)的相互作用。结果：rPE 与 Lp(a)结合，但不与 LDL 结合，且 rPEΔKK 与 Lp(a)的结合能力明显低于 rPE；赖氨酸类似物 6-氨基乙酸（EACA）能有效抑制 rPE 与 Lp(a)的结合；Lp(a)对 rPE 与 Plg 的结合具有微弱的抑制作用。结论：rPE 能够与 Lp(a)结合，其中 rPE 的 C 末端赖氨酸残基和 Apo(a)的赖氨酸结合位点（Lysine binding sites, LBS）是 rPE 与 Lp(a)结合的主要位点。

关键词　不可分型流感嗜血杆菌　PE 蛋白　脂蛋白（a）　纤溶酶原　赖氨酸结合位点

中图分类号　R378.4

不可分型流感嗜血杆菌（Nontypeable *Haemophilus influenza*, NTHi）是定植于人体呼吸道粘膜的一种条件致病菌，可引发人体尤其是儿童的鼻窦炎、急性中耳炎，也是慢性阻塞性肺炎（Chronic obstructive pulmonary disease, COPD）的主要病因[1]。同许多病原菌相同，NTHi 可通过纤溶酶原（Plasminogen, Plg）受体将 Plg 黏附在菌体表面，进而利用宿主的纤溶系统，降解胞外基质，达到深层侵入的目的[2]。

Plg 是一种单链糖蛋白，是纤溶系统的重要组成部分。它包含 5 个富含赖氨酸结合位点（Lysine-binding sites, LBS）的 Kringle 环状结构，可通过 Kringle 结构上的 LBS 识别 Plg 受体，尤其能显著识别含有 C 末端赖氨酸残基的 Plg 受体，且赖氨酸类似物 6-氨基乙酸（ε-aminocaproic acid, EACA）能够抑制这种结合[3, 4]。

* 通讯作者，电子信箱：han-runlin@163.com

NTHi 表面已知的 Plg 受体有天冬氨酸酶、E 蛋白、F 蛋白、P4 蛋白[5-8]。其中 E 蛋白（Protein E, PE）在 NTHi 入侵宿主过程中发挥着重要的作用，PE 作为 NTHi 表面 Plg 受体能与 Plg 结合，降解细胞外基质；PE 能够粘附宿主上皮细胞，触发炎症反应；也可结合玻连蛋白（Vitronectin, Vn），逃避先天免疫[9]。

脂蛋白（a）[Lipoprotein(a), Lp(a)]是存在于人和某些灵长类动物血浆中的一种脂蛋白，其正常生理功能至今仍不明确。Lp(a)由一分子的载脂蛋白（a）[Apolipoprotein(a), Apo(a)]和一分子的低密度脂蛋白（Low density lipoprotein, LDL）通过二硫键连接组成[10]。Apo(a)和 Plg 的 cDNA 具有高度同源性，两者均有富含 LBS 的 Kringle 环状结构，据此本实验室提出 Lp(a)可与 Plg 受体结合，进而竞争性的抑制 Plg 受体与 Plg 的结合，发挥 Lp(a)的抗感染作用，即 Lp(a)的抗感染假说[11, 12]。

本研究原核表达并纯化 rPE 及敲除 C 末端两个赖氨酸残基的突变体 rPEΔKK，再分离人血浆 Lp(a)，通过 ELISA、Pull down、Western blot 等方法对 rPE 与 Lp(a)的相互作用进行初步研究，为进一步研究 Lp(a)的抗感染作用提供依据。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及载体 NTHi ATCC49247 菌株购于卫生部临床检验中心；大肠杆菌（*Escherichia coli*, *E.coli*）BL21 及 *E.coli* JM109 购于 BBI 公司；pASK-IBA37Plus 质粒购于 IBA 公司。

1.1.2 主要试剂 2×Ultra-Pfu PCR Master Mix 购自于南京博尔迪公司；ClonExpress II 克隆试剂盒购于南京诺唯赞公司；HiTrap Q Sepharose™ Fast Flow 层析柱、TALON Superflow™ 填料购自于 GE Healthcare 公司；Pierce® BCA Protein Assay Kit、PageRuler™ Prestained Protein Ladder 购自于 Thermo 公司；Plg、鼠抗人 Plg 单抗、驴抗羊 IgG-HRP 购自于 R&D system 公司；LDL、羊抗人 Apo(a) 多抗购自于 Alfa Aesar 公司；KBr、EACA、羊抗人 LDL 多抗购自于 Sigma 公司；鼠抗 His-tag 单抗购于北京全式金公司；Precision Plus Protein™预染标准品购自于 Bio-Rad 公司。

1.1.3 主要仪器 Beckman Optima™L-100XP 超速离心机及 SW40Ti 转子；ÄKTA avant 25 全自动层析系统；BIO-RAD Mini Trans-Blot® 转印槽；BIO-RAD

PowerPac™ HC 高电流电泳仪电源；Hoefer TE70X 半干转仪；Bio-Tek 公司 Multi-Detection Microplate reader；Gene 公司 G:BOX Chemi XT4 凝胶成像系统；Cascada™ I 全新智能实验室超纯水系统购于 PALL 公司。

1.2 细菌培养

将 NTHi ATCC49247 菌株划线培养至 sBHI 固体培养基（BHI 培养基含 4μg/mL 的β-NAD 和 10μg/mL 的 Hemin），37℃，5%CO2 活化 24h，再转接至 sBHI 液体培养基中，37℃，200r/min 培养。*E.coli* 的培养均采用 LB 培养基。

1.3 基因克隆

1.3.1 引物 NCBI 查找 *pe* 基因序列，以 pASK-IBA37Plus 质粒为表达载体，按照 ClonExpress II 同源重组一步克隆的操作说明，利用诺唯赞公司在线软件设计引物（引物列表见表 1）。

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

Primer	Sequence (5'-3')	Restrictive enzymes
rPE	F: CGAGACCGCGGTCCCGAATTCAAGGCTAAACAAAATGATGTGAAGC	*EcoR Ⅰ*
	R: CCCCTGCAGGTCGACCTCGAGTTATTTTTTATCAACTGAAAATGCTTC	*XhoⅠ*
rPEΔKK	F: CGAGACCGCGGTCCCGAATTCAAGGCTAAACAAAATGATGTGAAGC	*EcoR Ⅰ*
	R: CCCCTGCAGGTCGACCTCGAGTTAATCAACTGAAAATGCTTCACCA	*XhoⅠ*

1.3.2 构建重组质粒 提取 NTHi 的基因组，电泳检测其纯度。以基因组为模板，分别扩增出 *pe*、*peΔkk* 片段，扩增条件为：94℃，3min；94℃，30s；54℃，30s；72℃，40s；30 个循环；72℃，10min。提取 pASK-IBA37Plus 质粒并进行双酶切。按照 ClonExpress II 同源重组一步克隆试剂盒的操作说明，将目的片段 *pe*、*peΔkk* 分别连接至 pASK-IBA37Plus 载体并转化至克隆感受态 *E.coli* JM109。将菌落 PCR 鉴定为阳性的菌株送去测序，提取测序结果显示未突变的菌株的质粒，转化至表达感受态 *E.coli* BL21，用于蛋白的诱导表达。

1.4 rPE 及 rPEΔKK 蛋白的诱导表达及纯化

以含 pASK-IBA37Plus-*pe* 和 pASK-IBA37Plus-*peΔkk* 重组质粒的菌株为工程菌，参照 IBA 公司操作手册，诱导表达 N 端携带 His 标签的 rPE 及 rPEΔKK。所得蛋白液经过 TALON Superflow™ 填料进行纯化，BCA 法测蛋白浓度[13]。

1.5 人血浆 Lp(a)的分离与鉴定

1.5.1 分离人血浆 Lp(a) 无菌采取健康人血，得血浆约 25mL（EDTA-K_2 为抗凝剂）。

加入固体 KBr 调节血浆浓度至 1.21g/mL，加入 1mmol/L 的 EDTA 作为抗氧化剂。配制 1.1、1.063、1.006g/mL 密度液（含 1mmol/L 的 EDTA），将四种密度液按照 4.5-3-3-1mL 的量由大到小铺至超离管。40000r/min，10℃离心 3h。取 1.063g/mL 处收集的液体，10℃透析 24h。

用 Wash buffer（150mmol/L NaCl，20mmol/L Tris，1mmol/L EDTA，pH7.4）平衡柱体积为 1mL 的 Q Sepharose™ Fast Flow 预装柱使 A_{280nm} 到达基线，流速为 0.5mL/min。将透析所得的蛋白液 0.22μm 过滤后上样，用 Wash buffer 洗脱未能与填料结合的杂蛋白，待将 A_{280nm} 洗至基线后换用洗脱液 Elution buffer（300mmol/L NaCl，20mmol/L Tris，1mmol/L EDTA，pH7.4）洗脱目的蛋白，接收 A_{280nm} 大于基线的流出液，0.22μm 过滤，BCA 法测得蛋白浓度。

1.5.2 SDS-PAGE 检测 Lp(a)纯度及 Western blot 鉴定 以 Alfa Aesar 公司的 LDL 做对照， SDS-PAGE 电泳（分离胶 6%，浓缩胶 4%）检测 Lp(a)的纯度。Western Blot 检测 Lp(a)中的 Apo(a)：将 SDS-PAGE 上的蛋白 400mA 湿转 2.5h 至 NC 膜，将 NC 膜于 5%脱脂乳（TBST 稀释）中室温封闭 1.5h，TBST 洗膜 3 次。再将 NC 膜置于含羊抗人 Apo(a)多抗（1∶20000 TBST 稀释）的 2%脱脂乳中室温孵育 1.5h，洗膜三次。最后加入含驴抗羊 IgG-HRP（1∶5000 TBST 稀释）的 2%脱脂乳中孵育 1.5h，洗膜三次。加适量发光试剂，凝胶成像仪成相。Western Blot 检测 Lp(a)中的 ApoB-100：一抗为羊抗人 ApoB-100 多抗（1∶20000 TBST 稀释），其他步骤同上。

1.6 rPE 与 Lp(a)的结合实验

1.6.1 ELISA 检测 rPE、rPEΔKK 与 Lp(a)的结合 分别将 rPE、rPEΔKK 稀释为 20μg/mL，100μL/孔包被至酶标板，PBS 做空白对照，室温孵育 1.5h 后用 200μL/孔的 TBST 洗板三次；加入 200μL/孔的 1%BSA 室温封闭 1.5h 后洗板三次；加入 100μL/孔的 Lp(a)（500、50、5 ng/孔），室温静置 1.5h 后洗板三次；加入 100μL/孔的羊抗人 Apo(a)多抗（1∶4000 TBST 稀释），室温静置 1.5h 后洗板三次；再加入 100μL/孔的驴抗羊 IgG-HRP（1∶1000 TBST 稀释），室温静置 1.5h 后洗板三次；最终加入 100μL/孔的四甲基联苯胺（TMB）显色液，室温作用 5min，100μL/孔的终止液终止，用酶标仪测定 OD_{450nm}。

1.6.2 Pull down 结合 Western blot 检测 rPE、rPEΔKK 与 Lp(a)的结合 向 3 个含 TALON

Superflow™ 填料的层析柱分别加入 rPE 及 rPEΔKK 各 100μg，同时 PBS 作为阴性对照。分别用 8CV 的 Wash buffer 洗脱未与填料结合的蛋白，再向 3 个层析柱分别加入 2mL 血浆，孵育 3min 并穿流三次，用 14CV 的 Wash buffer 洗去杂蛋白，再用 6CV 的 Elution buffer 洗脱目的蛋白。将上述洗脱液用 10%的 TCA 沉淀后制成电泳样，分别记为 rPE+Plasma、rPEΔKK+Plasma、PBS+Plasma。同时以 Lp(a)、血浆、rPE、rPEΔKK 为对照进行 Western blot。用于检测 Lp(a)的 Western blot 步骤同 1.5.2。用于检测 rPE、rPEΔKK 的 Western blot：将 SDS-PAGE 胶（浓缩胶 4%，分离胶 12%）上的蛋白 45mA 恒流半干转 30min 至 NC 膜上，一抗为鼠抗 His 标签单抗（1∶1000 TBST 稀释），二抗为羊抗鼠 IgG-HRP（1∶2000 TBST 稀释），其余步骤同 1.5.2。

1.7 rPE 与 Lp(a)结合机制的研究

1.7.1 ELISA 检测 rPE 与 LDL 的结合 方法基本同 1.6.1，LDL 的浓度为 500、50、5ng/孔，一抗为羊抗人 LDL 多抗（1∶10000 稀释），二抗为驴抗羊 IgG-HRP（1∶1000 稀释）。

1.7.2 ELISA 检测 EACA 对 rPE 与 Lp(a)结合的抑制 方法基本同 1.6.1，Lp(a)的浓度为 500ng/孔，EACA 的浓度分别为 0、0.2、2、20mmol/L。

1.7.3 ELISA 检测 rPE、rPEΔKK 与 Plg 的结合 方法基本同 1.6.1，Plg 的浓度为 500、50、5ng/孔，一抗为鼠抗人 Plg 单抗（1∶2000 稀释），二抗为羊抗鼠 IgG-HRP（1∶3000 稀释）。

1.7.4 ELISA 检测 Lp(a)对 rPE 与 Plg 结合的抑制 方法基本同 1.6.1，Plg 的浓度为 300ng/孔，Lp(a)的浓度分别为 0、50、500、1000ng/孔，抗体及稀释比例同 1.7.3。

2. 结果

2.1 基因克隆与重组蛋白的表达纯化

扩增出 *pe* 及 *peΔkk* 基因片段大小与理论值相符，经过连接、转化、菌落 PCR，测序结果显示目的片段的核苷酸序列与参考序列完全一致。经过诱导表达及纯化得到了纯度较高的 rPE 及 rPEΔKK，两者的分子大小与理论值相符，均为 16KDa。

2.2 Lp(a)的分离与鉴定

根据颗粒大小及密度的差异，KBr 密度梯度离心后，血浆脂蛋白漂浮在不同的密度液中，其中 1.063g/mL 处黄色一层主要为 LDL 和 Lp(a)，此时 SDS-PAGE 显示还有少量血清白蛋白（Human serum albumin, HSA）。经过 Q Sepharose™ Fast

Flow 阴离子交换层析，SDS-PAGE 电泳显示只有两条清晰的条带（图 1），说明 Lp(a)纯度较高。分别用羊抗人 Apo(a)多抗和羊抗人 ApoB-100 多抗进行 Western blot，结果显示 Lp(a)的两条清晰条带分别为 Apo(a)和 ApoB-100（图 1）。BCA 法测得 Lp(a)的浓度为 169μg/mL。

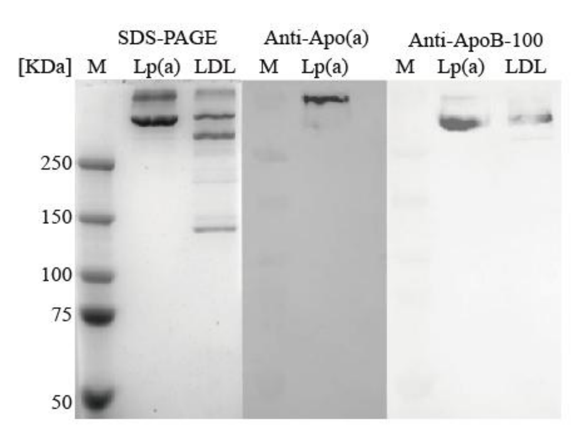


图 1　SDS-PAGE 和 Western blot 检测 Lp(a)纯度

Fig.1　Purity of Lp(a) identified by SDS-PAGE and Western blot

注：M：蛋白分子量标准（KDa）

Note: M: molecular mass markers (KDa)

2.3　rPE 与 Lp(a)的结合

2.3.1　ELISA 检测 rPE、rPEΔKK 与 Lp(a)的结合　结果（图 2）表明 rPE、rPEΔKK 均能与 Lp(a)结合，且呈浓度梯度依赖关系，当 Lp(a)浓度在 0~500ng/孔时，结合值随 Lp(a)浓度的升高而升高。rPEΔKK 与 Lp(a)的结合能力明显低于 rPE，当 Lp(a)浓度为 50ng/孔时，rPEΔKK 与 Lp(a)的结合值下降 58.42%。

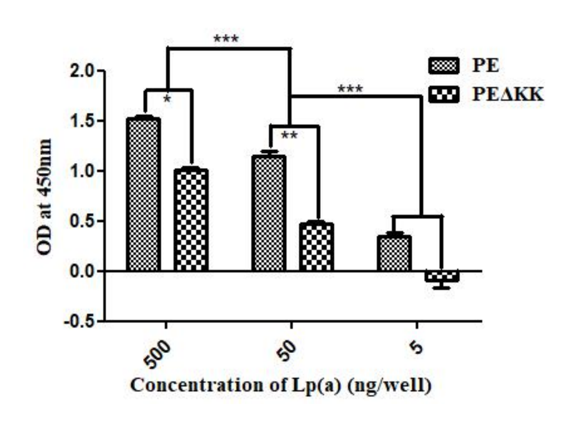


图 2　ELISA 检测 rPE、rPEΔKK 与 Lp(a)的结合

Fig.2　Interaction of rPE, rPEΔKK with Lp(a) detected by ELISA

注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001

Note: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

2.3.2　亲和色谱层析检测 rPE、rPEΔKK 与 Lp(a)的结合　Western blot 结果（图 3）与

ELISA 结果相符，rPE、rPEΔKK 均与血浆中的 Lp(a)结合，且 rPEΔKK 与 Lp(a)的结合明显减弱。

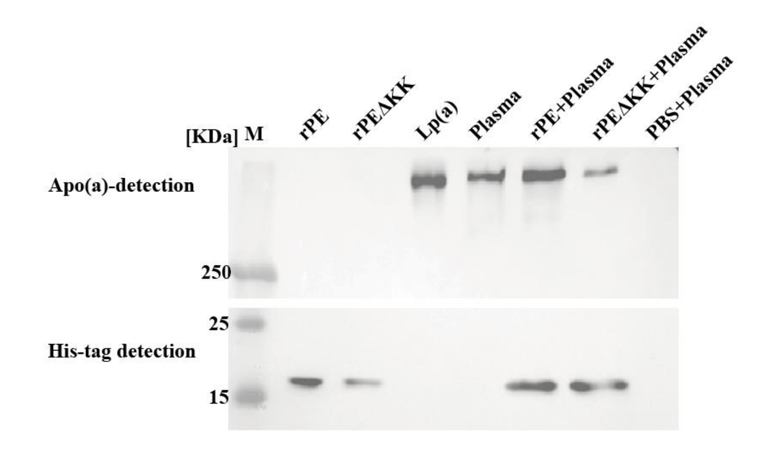


图 3　Pull down 结合 Western blot 检测 rPE、rPEΔKK 与 Lp(a)的结合

Fig.3　Interaction of rPE, rPEΔKK with Lp(a) detected by Pull down followed with Western blot

注：M：蛋白分子量标准（KDa）

Note: M: molecular mass markers (KDa)

2.4　rPE 与 Lp(a)的结合机制

2.4.1　ELISA 检测 rPE 与 LDL 的结合　ELISA 结果显示（图 4）rPE 与 LDL 不结合。

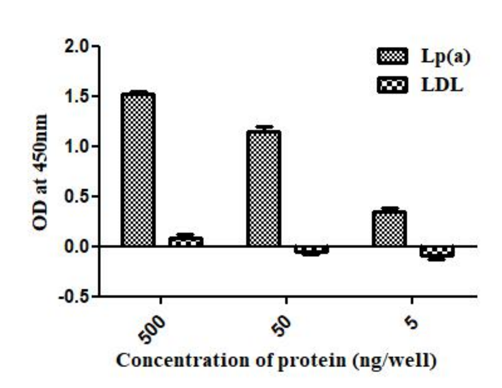


图 4　ELISA 检测 rPE 与 LDL 的结合

Fig. 4　Interaction of rPE with LDL detected by ELISA

2.4.2　ELISA 检测 EACA 对 rPE 与 Lp(a)结合的抑制　结果显示（图 5），一定浓度的 EACA 能够抑制 rPE 与 Lp(a)的结合，当 EACA 浓度为 0.2、2、20mmol/L 时，rPE 与 Lp(a)的结合值分别下降 9.09%、68.34%、91.19%。

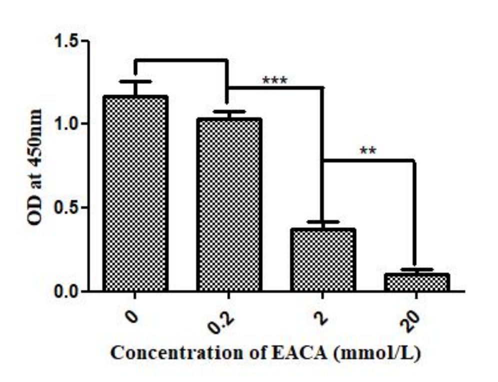


图 5　EACA 抑制 rPE 与 Lp(a)的结合

Fig. 5　The inhibition of EACA for the binding of rPE to Lp(a)

注：**P<0.01，***P<0.001　　Note: **P<0.01, ***P<0.001

2.4.3　ELISA 检测 rPE、rPEΔKK 与 Plg 的结合　ELISA 结果显示（图 6），rPE、rPEΔKK 均能与 Plg 结合，并呈浓度梯度依赖关系。rPEΔKK 与 Plg 结合值下降不明显，当 Plg 的浓度为 500ng/孔时，rPEΔKK 与 Plg 的结合值下降 15%。

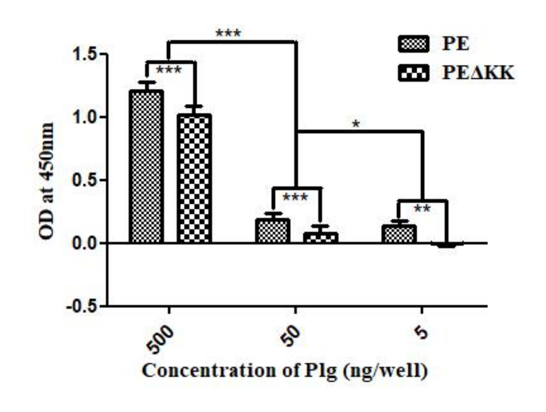


图 6　ELISA 检测 rPE、rPEΔKK 与 Plg 的结合

Fig. 6　Interaction of rPE, rPEΔKK with Plg detected by ELISA

注：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001

Note: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

2.4.4　ELISA 检测 Lp(a)对 rPE 与 Plg 结合的抑制　结果（图 7）显示，Lp(a)对 rPE 与 Plg 结合的抑制作用不明显。当 Lp(a)的浓度为 50ng/孔时，rPE 与 Plg 的结合值下降 10%。

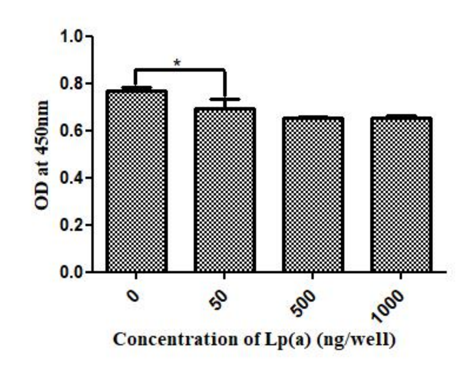


图 7　Lp(a)对 rPE 与 Plg 结合的抑制

Fig. 7　The inhibition of the binding of rPE to Plg by Lp(a)

注：*P<0.05　　Note: *P<0.05

3. 讨论

目前，纯化 Lp(a)的常规方法是序列超速离心结合分子筛层析[14, 15]，此法能批量纯化 Lp(a)，但超离时间长，且分子筛层析不能有效分离 LDL 和 Lp(a)。本研究采用密度梯度离心，缩短了超离时间，结合 QFF 离子交换层析，能够有效分离 Lp(a)中混有的 LDL，最终纯化出纯度较高的 Lp(a)。

自 1963 年首次发现 Lp(a)以来，人们对 Lp(a)的研究主要集中在心血管疾病方面，而对其生理功能至今仍不明确[16]。基于 Lp(a)与 Plg 结构的相似性，本实验室提出了 Lp(a)的抗感染假说并对 rPE 与 Lp(a)的相互作用进行了初步研究。结果表明，rPE 能与 Lp(a)结合，但不与 LDL 结合，说明 rPE 主要与 Lp(a)中的 Apo(a)结合。EACA 能有效抑制 rPE 与 Lp(a)的结合，表明 rPE 主要是与 Apo(a)中的 LBS 结合的。ELISA 和 Pull down 实验结果均显示：敲除 C 末端两个赖氨酸残基的 rPEΔKK 与 Lp(a)的结合能力明显减弱，说明 Lp(a)主要与 PE 蛋白 C 末端的两个赖氨酸残基结合。总之，rPE 能与 Lp(a)结合，并且 rPE 的 C 末端赖氨酸残基和 Apo(a)的 LBS 是 rPE 与 Lp(a)结合的主要位点。

ELISA 实验结果表明 Lp(a)对 PE 与 Plg 结合的抑制不明显。Barthel D 等[6]指出 PE 蛋白主要通过 N 端第 41~68 个氨基酸与 Plg 结合，本研究也发现 rPEΔKK 与 Plg 的结合值下降不明显，说明 rPE 的 C 末端赖氨酸残基并不是 PE 与 Plg 的主要结合部位，而本研究结果表明 Lp(a)主要与 PE 的 C 末端赖氨酸残基结合。PE 与 Plg、Lp(a)的结合位点不同，因此 Lp(a)对 PE 与 Plg 结合的抑制不明显。

本实验室已经证实 Lp(a)能与多种病原菌表面的 Plg 受体结合，进而竞争性的抑制病原菌与 Plg 的结合，从而可能发挥抗感染作用，例如金黄色葡萄球菌表

面的α-烯醇化酶和次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶，A 群链球菌表面的烯醇化酶和三磷酸甘油醛脱氢酶，铜绿假单胞杆菌表面的二氢硫辛酸酰胺脱氢酶，以及 NTHi 表面的天冬氨酸酶和 PF 蛋白[13, 17-22]。本研究表明 NTHi 表面 Plg 受体之一，PE 蛋白可与 Lp(a)结合，但 Lp(a)对 PE 与 Plg 结合的抑制作用较弱，因此这种相互作用的生理或病理意义有待于进一步研究。

参考文献

[1] Duell B L, Su Y C, Riesbeck K. Host-pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. Febs Letters, 2016, 590(21): 3840-3853.

[2] Bhattacharya S, Ploplis V A, Castellino F J. Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 2012: 482096.

[3] Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen T K. Bacterial plasminogen activators and receptors. Fems Microbiology Reviews, 2001, 25(5): 531-552.

[4] Sun Z, Chen Y H, Wang P, et al. The blockage of the high-affinity lysine binding sites of plasminogen by EACA significantly inhibits prourokinase-induced plasminogen activation. Biochimica Et Biophysica Acta, 2002, 1596(2): 182-192.

[5] Sjostrom I, Grondahl H, Falk G, et al. Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. Biochimica Et Biophysica Acta, 1997, 1324(2): 182-190.

[6] Barthel D, Singh B, Riesbeck K, et al. *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. Journal of Immunology, 2012, 188(1): 379-385.

[7] Su Y C, Jalalvand F, Morgelin M, et al. *Haemophilus influenzae* acquires vitronectin via the ubiquitous Protein F to subvert host innate immunity. Molecular Microbiology, 2013, 87(6): 1245-1266.

[8] Su Y C, Mukherjee O, Singh B, et al. *Haemophilus influenzae* P4 interacts with extracellular matrix proteins promoting adhesion and serum resistance. Journal of Infectious Diseases, 2016, 213(2): 314-323.

[9] Hallstrom T, Blom A M, Zipfel P F, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. Journal of Immunology, 2009, 183(4): 2593-2601.

[10] Berg K. Lp(a) lipoprotein: an overview. Chemistry and Physics of Lipids, 1994, 67-68: 9-16.

[11] Mclean J W, Tomlinson J E, Kuang W J, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. Nature, 1987, 330(6144): 132-137.

[12] Han R L. Plasma lipoproteins are important components of the immune system, 2010, 54(4): 246-253.

[13] Li W L, Xu L P, Zhang Y K, et al. Lipoprotein (a) binds to recombinant nontypeable *Haemophilus influenzae* aspartase. American Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 3(5): 314-321.

[14] Albers J J, Hazzard W R. Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein. Lipids, 1974, 9(1): 15-26.

[15] Romagnuolo R, Marcovina S M, Boffa M B, et al. Inhibition of plasminogen activation by apo(a): role of carboxyl-terminal lysines and identification of inhibitory domains in apo(a). Journal of Lipid Research, 2014, 55(4): 625-634.
[16] Schmidt K, Noureen A, Kronenberg F, et al. Structure, function, and genetics of lipoprotein(a). Journal of Lipid Research, 2016, 57(8): 1339-1359.
[17] 许颖, 纪智星, 韩润林. 重组金黄色葡萄球菌次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶与脂蛋白(a)的相互作用. 微生物学通报, 2011, (09): 1405-1411.
Xu Y, Ji Z X, Han R L. The interaction between Lipoprotein(a) and recombinant inosine 5'-monophosphate dehydrogenase derived from *Staphylococcus aureus*. Microbiology China, 2011, (09): 1405-1411.
[18] Xu L P, Bai W C, Ji Z X, et al. Lipoprotein (a) binds to C-terminal lysine residues of recombinant enolase derived from group A *streptococcus*. Clinical and Experimental Medicine, 2015, 3(5): 327-331.
[19] 代霄燕, 许丽萍, 白文成, 等. 重组 A 群链球菌三磷酸甘油醛脱氢酶与脂蛋白(a)的相互作用. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2011, (03): 27-31.
Dai X Y, Xu L P, Bai W C, et al. The interaction between Lipoprotein(a) and recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase derived from group A s*treptococcus*. Journal of Inner Mongolia Agricultural University, 2011, (03): 27-31.
[20] 刘恩，李文龙，韩润林. 不可分型流感嗜血杆菌 F 蛋白的重组表达及其与脂蛋白（a）的相互作用. American Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 4(3): 338-343.
Liu E, Li W L, Han R L. The interaction between recombinant protein F derived from nontypeable *Haemophilus influenzae* and lipoprotein(a). American Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 4(3): 338-343.
[21] 纪智星, 白文成. 人脂蛋白(a)与金黄色葡萄球菌重组α-烯醇化酶的相互作用. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2017, (02): 1-6.
Ji Z X, Bai W C. The interaction between human Lipoprotein(a) and recombinant α-enolase derived from *Staphylococcus aureus*. Journal of Inner Mongolia Agricultural, 2017, (02): 1-6.
[22] 王洋, 李文龙, 刘恩, 等. 铜绿假单胞菌二氢硫辛酸酰胺脱氢酶的重组表达及其与脂蛋白(a)的相互作用. 微生物学通报, 2017, (01): 172-177.
Wang Y, Li W L, Liu E, et al. The interaction between Lipoprotein(a) and recombinant dihydrolipoamide dehydrogenase derived from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology China, 2017, (01): 172-177.

The interaction between plasma lipoprotein(a) and recombinant protein E derived from nontypeable *Haemophilus influenza*

WANG Yu[1, 4] LIU Zhi[1, 4] BAI Wen-cheng[2, 4] Xu Li-ping[3] HAN Run-lin[2, 4]

(1 College of Life Science, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, 010018, China)

(2 College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, 010018, China)

(3 College of Basic medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, 010018, China)

(4 Research Center of Plasma Lipoprotein Immunology, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot, 010018, China)

Abstract Objective: Protein E (PE), with two lysine residues at its C-terminus, is a plasminogen (Plg) receptor on the surface of nontypeable *Haemophilus influenza* (NTHi). NTHi can recruit Plg on the cell surface by PE and utilize host fibrinolytic system to achieve its immune invasion. Based on the high homology of Plg and Apolipoprotein(a) [Apo(a)] of Lipoprotein(a) [Lp(a)], Lp(a) was supposed to bind to PE. Methods: In this study, the recombinant PE (rPE) and C-terminal lysine residues-deleted variant (rPEΔKK) were obtained by prokaryotic expression and further purified. Lp(a) was isolated and purified from human plasma by KBr density gradient centrifugation followed by Q Sepharose™ Fast Flow ion exchange chromatography. The interaction between rPE and Lp(a) was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and Pull down followed by Western blot. Results: The results indicated that rPE could bind to Lp(a) but not to LDL, and the interaction was significantly inhibited by EACA. The binding capacity of rPEΔKK to Lp(a) was obviously lower than that of rPE. In addition, Lp(a) could inhibit the binding of rPE to Plg slightly. Conclusion: In overall, Lp(a) could bind to rPE and the C-terminal lysine residues of rPE and the lysine binding site(LBS) of Apo(a) was responsible for this interaction.

Key words Nontypeable *Haemophilus influenza* Protein E Lipoprotein(a) Plasminogen Lysine binding sites